

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/435, 16/18</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/28457</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年6月10日(10.06.99)		
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 45%; vertical-align: top;"> <b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/05306   <b>(22) 国際出願日</b> 1998年11月25日(25.11.98)   <b>(30) 優先権データ</b>            特願平9/343789 1997年11月28日(28.11.97) JP            特願平10/126803 1998年4月20日(20.04.98) JP   <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b>            大塚製薬株式会社            (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP)            〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地            Tokyo, (JP)  <b>(72) 発明者 : および</b>  <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b>            原田陽介(HARADA, Yosuke)(JP/JP)            〒770-0868 徳島県徳島市福島1-6-55            レジデンス福島705 Tokushima, (JP)            尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)(JP/JP)            〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67            リバーサイド南末広7番館 Tokushima, (JP)         </td> <td style="width: 55%; vertical-align: top;"> <b>(74) 代理人</b>            弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.)            〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1            北浜TNKビル Osaka, (JP)   <b>(81) 指定国</b> CA, CN, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).             添付公開書類            国際調査報告書         </td> </tr> </table>			<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/05306  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年11月25日(25.11.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/343789 1997年11月28日(28.11.97) JP 特願平10/126803 1998年4月20日(20.04.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 : および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 原田陽介(HARADA, Yosuke)(JP/JP) 〒770-0868 徳島県徳島市福島1-6-55 レジデンス福島705 Tokushima, (JP) 尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)(JP/JP) 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイド南末広7番館 Tokushima, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CA, CN, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/05306  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年11月25日(25.11.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/343789 1997年11月28日(28.11.97) JP 特願平10/126803 1998年4月20日(20.04.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 : および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 原田陽介(HARADA, Yosuke)(JP/JP) 〒770-0868 徳島県徳島市福島1-6-55 レジデンス福島705 Tokushima, (JP) 尾崎浩一(OZAKI, Kouichi)(JP/JP) 〒770-0865 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイド南末広7番館 Tokushima, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CA, CN, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書			
<b>(54) Title: TSA305 GENE</b>  <b>(54) 発明の名称</b> TSA305遺伝子  <b>(57) Abstract</b> A pancreas-specific gene which contains a base sequence encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and is utilizable in the fields of study, diagnosis and therapy of pancreatic carcinoma.				

(57)要約

本発明は、特に膵臓癌の研究、診断、治療等の分野で有効な、配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む膵臓特異的遺伝子を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国			NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	JP	日本				
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国	RU	ロシア		
EE	エストニア	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
		LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

## T S A 3 0 5 遺 伝 子

技 術 分 野

本発明は脾臓に特異的に発現する蛋白をコードする遺  
5 伝子 T S A 3 0 5、より詳しくは、線虫の *se1-1* と  
高い相同性を有し、癌に対して抑制的に働くと考えられ  
る上記脾臓特異的遺伝子に関する。また本発明は、かか  
る遺伝子によってコードされる新規な蛋白質及びその特  
異抗体にも関する。

10

背 景 技 術

脾臓癌は、日本人及び西側諸国の癌関連死亡順位にお  
いて4位及び5位を占める、消化器系の悪性腫瘍の中  
でも最も予後不良な癌である(Poston, J. G., et al.,  
Gut., 32, 800-812 (1991))。癌研究における最も重要な  
15 ゴールは、癌化に至る早期の遺伝子変化を見分けること  
である。この変化の見極めができれば、早期診断のため  
の遺伝子的なツールの開発とこの致死的な疾患をより効  
果的に治療するための新規な治療的アプローチとを導く  
ことができる。

20

一方、線虫の *se1-1* 遺伝子は、線虫において神経  
発生の際の外胚葉からニューロblastへの分化を抑制  
する *Notch / lin-12* に対して、抑制的に働く

ことが報告されている (Genetics, 143 (1), 237-247 (1996) : Development, 124 (3), 637-644 (1997))。該 N o t c h / l i n - 1 2 は、その強制発現が乳癌や白血病を惹起させるため、癌関連遺伝子と考えられている。

- 5 該癌関連遺伝子の抑制的な働きをなす上記 s e l - 1 遺伝子は、従って癌に対しても抑制的に働くと考えられるが、現在尚之等遺伝子の役割については明確に解明されている訳ではない。

- かかる遺伝子の生理的役割の解明とそれにより得られる情報は、癌化や炎症等の疾患の発症機能の解明に重要であり、これらは、基礎科学研究の分野はもとより、医薬品分野においても癌や炎症等の疾患の解明やその処置法等の開発面からも望まれているところである。

#### 発 明 の 開 示

- 15 本発明は、斯界で要望される前記の情報、殊に s e l - 1 遺伝子と相同性を有する新規な蛋白相同物をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

- 上記目的より、本発明者は、各種ヒト組織由来の遺伝子につき検索を重ねた結果、新たに脾臓に特異的に発現  
20 する蛋白をコードする遺伝子の単離、同定に成功し、該遺伝子が上記目的に合致することを見だし、ここに本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む膵臓特異的遺伝子 T S A 3 0 5、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

- 5     また本発明によれば、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる膵臓特異的蛋白質（T S A 3 0 5 蛋白）及びこれに結合性を有する抗体が提供される。

- 更なる本発明によれば、以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなる膵臓特異的遺伝子 T S A  
10   3 0 5、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。  
(a)配列番号：2で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド、  
(b)配列番号：2で示される塩基配列からなるDNAと  
ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌ  
15   クレオチド。

加えて、本発明によれば、遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用されるDNA断片である上記遺伝子が提供される。

- 以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配  
20   列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological  
Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、

「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「T S A 3 0 5」と名付けられたP C R産物のD N A配列から演繹されるものを挙げることができる。その塩基配列は、配列番号：3に示されるとおりである。

該遺伝子は、配列番号：1に示される794アミノ酸配列の新規な膵臓特異的蛋白（T S A 3 0 5蛋白という）をコードする、配列番号：2で示される塩基配列の、コード領域を含むヒトc D N Aであり、全長7885塩基からなっている。

本発明遺伝子T S A 3 0 5の発現産物であるT S A 3 0 5蛋白は、F A S T Aプログラム（Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2444-2448（1988））を利用したGenBank/EMBLデータベースの検索の結果、線虫のs e l - 1遺伝子（前記文献参照）と非常に高い相同性を有していることが確認された。このことから、本発明遺伝子は、胚発生の全般に関わるとされている癌関連遺伝子であるN o c t c h / l i n - 1 2に対して、上記s e l - 1と同様に、抑制的に働くと考えられる。

また、本発明遺伝子の染色体上の位置は、インスリン依存性糖尿病（I D D M）の原因遺伝子が存在するとされる第14染色体q 2 4 . 3 - q 3 1 . 1である。このことから、本発明遺伝子は、糖尿病との関連が強く示唆  
5 される。

更に、本発明遺伝子の発現産物は、フィブロネクチンType IIコラーゲン結合ドメインを含む蛋白であることが明らかとなった。かかるN末端付近のコラーゲン結合部位は線維化との関わりを示唆するものであり、この  
10 ことから本発明遺伝子は、線維症との関連も強く示唆される。

加えて、本発明遺伝子は、試験した膵癌標本の全てにおいてその発現の欠失が認められ、主に正常膵臓に発現することから、癌化における潜在的な予測の価値を提言  
15 する。

このように、本発明に係わる遺伝子T S A 3 0 5及びその発現産物の提供は、乳癌、白血病、線維症、糖尿病、膵癌等の各種疾患、殊に膵癌の解明、把握、診断、予防及び治療等に極めて有用な情報乃至手段を与える。また、  
20 本発明遺伝子は、上記各種疾患の処置に利用される本発明遺伝子の発現を誘導する新規薬剤の開発の上でも好適に利用できる。更に、個体或は組織における本発明遺伝

子の発現又はその発現産物の検出や、該遺伝子の変異（欠失や点変異）又は発現異常の検出等は、上記疾患の解明や診断上において好適に利用できると考えられる。

本発明遺伝子は、具体的には配列番号：1で示される  
5 アミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子又は配列番号：2で示される塩基配列を含むポリヌクレオチドからなる遺伝子として例示されるが、特にこれらに限定されることなく、例えば、上記特定のアミノ酸配列において一定の改変を有する遺伝子や上記特  
10 定の塩基配列と一定の相同性を有する遺伝子であることができる。

即ち、本発明遺伝子には、配列番号：1に示されるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなりT S A 3 0 5と  
15 同様の活性を有する蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子もまた包含される。ここで、「アミノ酸の欠失、置換又は付加」の程度及びそれらの位置等は、改変された蛋白質が、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と同様の機能を有する同効物であれば特に制  
20 限されない。尚、上記複数は、2以上、通常数個を意味する。

上記アミノ酸配列の改変（変異）等は、天然において、



例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）に基づいて人為的に改変することもできる。本発明は、このような改変・変異の原因及び手段等を問わず、上記  
5 特性を有する全ての改変遺伝子を包含するものである。

上記の人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154: 350, 367-382 (1987); 同 100: 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984); 続生化学実験講座 1  
10 「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)] 等の遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967); 同 91: 3350 (1969); Science, 150: 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981); 同 24:  
15 245 (1983)] 及びそれらの組合せ方法等が例示できる。

本発明遺伝子のひとつの態様としては、配列番号：3で示される塩基配列の全部或は一部を含むポリヌクレオチドからなる遺伝子を例示できる。この塩基配列に含まれるオープンリーディングフレーム（配列番号：2に示  
20 す塩基配列）は、上記アミノ酸配列（配列番号：1）の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例でもあり、本発明遺伝子はこれらに限らず、各アミノ酸残基に対し

て任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度等を考慮することができる〔Nucleic Acids Res., 9: 43 (1981)〕。

- 5      また、本発明遺伝子は、例えば配列番号：2に示されるように、一本鎖DNAの塩基配列として表示されるが、本発明はかかる塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドやこれらの両者を含むコンポーネントも当然に包含するものであり、またcDNA等のDNAに
- 10   限定されることもない。

更に、本発明の遺伝子には、前記のとおり、配列番号：2に示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチドからなるものに限定されず、当該塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含される。

- 15   かかる遺伝子としては、少なくとも、下記に掲げるようなストリンジェントな条件下で、配列番号：2で示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、一定の条件下での洗浄してもこれより脱離しないものが挙げられる。

- 20      即ち、配列番号：2の塩基配列を有するDNAと、6×SSC中65℃一夜の条件下或は50%ホルムアミドを含む4×SSC中37℃一夜の条件下においてハイブ

リダイズし、 $2 \times \text{SSC}$  中  $65^\circ\text{C}$  での 30 分間の洗浄条件下においても該 DNA から脱離しない塩基配列を有する遺伝子が例示される。ここで、SSC は、標準食塩 - クエン酸緩衝液 (standard saline citrate;  $1 \times \text{SSC} =$   
5  $0.15\text{M NaCl}$ ,  $0.015\text{M sodium citrate}$ ) である。

本発明の遺伝子は、その具体例についての配列情報に基づいて、一般的な遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験  
10 講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) 等参照]。

具体的には、本発明遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従って cDNA ライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブ  
15 や抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78: 6613 (1981); Science, 222: 778 (1983) 等]。

上記において、cDNA の起源としては、本発明遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養  
20 細胞等、特に脾臓組織が例示され、これらからの全 RNA の分離、mRNA の分離や精製、cDNA の取得とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。

尚、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社（Clontech Lab. Inc.）より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

- 5 本発明遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAにより産生される蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的
- 10 のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたプラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せ等を例示できる。

ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成された

- 15 DNA等が一般的に例示できるが、勿論既に取得された本発明遺伝子そのものやその断片等も良好に利用できる。

また、本発明遺伝子のスクリーニングは、上記特異抗体に代えてTSA305蛋白を利用した、蛋白質相互作用クローニング法（protein interaction cloning procedure）によることもでき、更に、本発明遺伝子の塩基配

20 列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用

いたスクリーニング方法によることもできる。

本発明では、またディファレンシャルディスプレイ法  
(Liand P., et al., Science, 257, 967-971 (1992))  
によって、異なる条件下の細胞もしくは複数の異なる細  
5 胞群間の mRNA の発現を直接比較、検討することがで  
きる。

本発明遺伝子の取得に際しては、PCR法〔Science,  
230: 1350 (1985)〕によるDNA/RNA増幅法も好適  
に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNA  
10 が得られ難いような場合にはレース法(RACE:  
Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学、12(6):  
35 (1994))、殊に5' - レース(5' - RACE)法  
〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8: 8998 (1988)〕等  
の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使  
15 用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにさ  
れた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、  
これは常法に従い合成できる。

尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前  
記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法  
20 等によればよい。

上記で得られる本発明遺伝子或は各種DNA断片は、  
常法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci.,

USA., 74: 5463 (1977)] やマキサムーギルバート法  
[Method in Enzymology, 65: 499 (1980)] 等に従って、  
また簡便には市販のシーケンスキット等を用いて、そ  
の塩基配列を決定することができる。

- 5 本発明遺伝子の利用によれば、一般の遺伝子工学的手法を用いることにより、その遺伝子産物を容易に大量に安定して製造することができる。従って、本発明は、本発明にかかる T S A 3 0 5 遺伝子を含有するベクター  
(発現ベクター) 及び該ベクターによって形質転換され  
10 た宿主細胞並びに該宿主細胞を培養して T S A 3 0 5 蛋白を製造する方法をも提供するものである。

該製造方法は、通常の遺伝子組換え技術 [Science, 224: 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130: 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80:  
15 5990 (1983) 及び前記引用文献等参照] に従って実施できる。

上記宿主細胞としては、原核生物及び真核生物のいずれも用いることができ、例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌といった一般的に用いられるものが広く  
20 挙げられ、好適には大腸菌、とりわけエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K 1 2 株に含まれるものが例示できる。また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵

母等の細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞〔Cell, 23: 175 (1981)〕やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77: 42 5 16 (1980)〕等が、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞等が好適に用いられている。勿論、これらに限定される訳ではない。

原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺  
10 伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及びSD（シャイン・アンド・ダルガーノ）塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン（例えばATG）を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例  
15 えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13等がよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができる。大腸菌を利用した発現系に用い得る上記ベクターの市販品としては、  
例えばpGEX-4T（Amersham Pharmacia Biotech社）、  
20 pMAL-C2、pMAL-P2（New England Biolabs社）、pET21、pET21/lacq（Invitrogen社）、pBAD/His（Invitrogen社）

等を例示できる。

- 脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアダ  
5 ニル化部位及び転写終了配列を保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には例えばSV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr〔Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)〕等が例示できる。上記以  
10 外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクターの市販品としては、例えばpEGFP-N, pEGFP-C (Clontech社)、pIND (Invitrogen社)、p cDNA 3. 1 / His (Invitrogen社)等の動物細胞  
15 用ベクターや、pFastBacHT (GibcoBRL社)、pAcGH LT (PharMingen社)、pAc5 / V5 - His, pMT / V5 - His, pMT / Bip / V5 - his (以上Invitrogen社)等の昆虫細胞用ベクター等が挙げられる。
- 20 また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82〔Proc. Natl. Acad.



Sci., USA., 80: 1 (1983)) 等が例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えば p P I C Z (Invitrogen社), p P I C Z  $\alpha$  (Invitrogen社) 等が包含される。

- 5 プロモーターとしても特に限定なく、エッシェリヒア属菌を宿主とする場合は、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PRプロモーター等を好ましく利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等が好ましい。
- 10 酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えば pH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等を好適に利用できる。また、動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、
- 15 S V 4 0 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、S R  $\alpha$  プロモーター等を例示できる。

- 尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白質発現ベクターも好ましく利用できる。該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として発現させるため
- 20

の p G E X (Promega社) 等を例示できる。

所望の組換え D N A (発現ベクター) の宿主細胞への導入方法・形質転換法にも特に制限はなく、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体も、常法  
5 に従い培養することができ、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的の T S A 3 0 5 蛋白が発現・産生され、形質転換体の細胞内、細胞外若しくは細胞膜上に蓄積若しくは分泌される。

上記培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞  
10 胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

かくして得られる組換え蛋白 (T S A 3 0 5 蛋白) は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作従って分離、精製することができる

15 [「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年 6月23日株式会社東京化学同人発行; Biochemistry, 25(25): 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163: 313 (1987) 等参照]。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理 (塩析法)、  
20 遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニ

ティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー  
(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、  
これらの組合せ等が挙げられ、特に好ましい上記方法と  
しては、本発明のTSA305蛋白の特異抗体を結合さ  
5 せたカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィー  
を例示できる。

しかして、本発明は、例えば上記の如くして得られる、  
新規なTSA305蛋白自体をも提供するものである。  
該蛋白は、前記のとおり、線虫のse1-1と高い相同  
10 性を有し、各種癌に対して抑制的に働く作用を奏し得る  
ところから、医薬分野において有用である。

また、このTSA305蛋白は、該蛋白の特異抗体を  
作成する為の免疫抗原としても利用できる。ここで抗原  
として用いられるコンポーネントは、例えば上記遺伝子  
15 工学的手法に従って大量に産生された蛋白或はそのフラ  
グメントであることができ、これら抗原を利用すること  
により、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）及びモノ  
クローナル抗体を収得することができる。該抗体の製造  
方法自体は、当業者によく理解されているところであり、  
20 本発明においてもこれら常法に従うことができる〔続生  
化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編  
(1986)等参照〕。

例えば、抗血清の取得に際して利用される免疫動物としては、ウサギ、モルモット、ラット、マウスやニワトリ等の通常動物を任意に選択でき、上記抗原を使用する免疫方法や採血等もまた常法に従い実施できる。

- 5      また、モノクローナル抗体の取得も、常法に従い、上記免疫抗原で免疫した動物の形質細胞（免疫細胞）と形質細胞腫細胞との融合細胞を作成し、これより所望抗体を産生するクローンを選択し、該クローンの培養により実施することができる。免疫動物は、一般に細胞融合に
- 10    使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択され、通常マウスやラット等が有利に用いられている。免疫は、上記抗血清の場合と同様であり、所望により通常のアジュバント等と併用して行なうこともできる。

- 尚、融合に使用される形質細胞腫細胞としても、特に
- 15    限定なく、例えば p 3 (p3/x63-Ag8) [Nature, 256: 495-497 (1975)]、p 3 - U 1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7 (1978)]、
- NS - 1 [Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976)]、
- MPC - 1 1 [Cell, 8: 405-415 (1976)]、SP 2 / 0
- 20    [Nature, 276: 269-271 (1978)] 等、ラットにおける R 2 1 0 [Nature, 277: 131-133 (1979)] 等及びそれらに由来する細胞等の各種の骨髓腫細胞をいずれも使用で

きる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルス（HVJ）等の存在下に公知の方法に準じて行なうことができ、所望のハイブリドーマの分離もまた同様に行ない得る〔Meth. in Enzymol., 73: 3 (1981); 上記続生化学実験講座等〕。

また、目的とする抗体産生株の検索及び単一クローン化も常法により実施され、例えば抗体産生株の検索は、上記の本発明抗原を利用したELISA法〔Meth. in Enzymol., 70: 419-439 (1980)〕、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニー（Ouchterlony）法、ラジオイムノアッセイ等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法に従い実施することができる。

かくして得られるハイブリドーマからの本発明抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法により培養してその培養上清として得る、また、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得る方法等により実施される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。このようにして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等の

通常の手段により精製することができる。

かくして得られる抗体は、本発明の T S A 3 0 5 蛋白に結合性を有することによって特徴付けられ、これは、前述した T S A 3 0 5 蛋白の精製及びその免疫学的手法  
5 による測定乃至識別等に有利に利用できる。本発明は、かかる新規な抗体をも提供するものである。

また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組  
10 織における本発明遺伝子の発現の検出を行うことができる。

かかる検出は常法に従って行うことができ、例えば R T - P C R [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of  
15 RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)] による R N A 増幅やノーザンブロット解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、  
in situ R T - P C R [Nucl. Acids Res., 21: 3159-  
20 3166 (1993)] や in situ ハイブリダイゼーション等の細胞レベルでのそれら測定、N A S B A 法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350: 91

-92 (1991)) 及びその他の各種方法によりいずれも良好に実施し得る。

尚、R T - P C R 法を採用する場合において、用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り何等限定されず、本発明の遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することができる。通常、これは20～30ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができる。

このように、本発明は、本発明にかかるT S A 3 0 5 遺伝子の検出用の特異プライマー及び／又は特異プローブとして使用されるD N A 断片をも提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は実施例1の(2)に従うノーザンブロット分析により調べた本発明遺伝子のヒト組織における分布を示す図面代用写真である。

図2は実施例1の(4)に従う、正常脾臓細胞(ノーマル, Normal)、4種の細胞株(Cell line)をR T - P C R 分析した結果を示す図面代用写真であり、上段はT S A 3 0 5 の結果を、下段はコントロールとしての $\beta_2$ -ミクログロブリンの結果を示す。

図3は実施例1の(5)に従う、脾臓サンプルその他をR T - P C R 分析した結果を示す図面代用写真であり、

上段はT S A 3 0 5の結果を、下段はコントロールとしての $\beta_2$ -ミクログロブリンの結果を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

#### 実施例 1

##### (1-1) $[\alpha - ^{33}\text{P}] \text{ ATP}$ で標識した表出方法

組織特異的な手法において発現したヒト遺伝子を確認するために $[\alpha - ^{33}\text{P}] \text{ ATP}$ で標識した表出方法を用いた。該方法の手順は本質的に以下に示すリアングの方法 (Liang P., et al., Science, 257, 967-971 (1992))によって行なった。

即ち、13のヒト組織（成人脳、胎児脳、肺、肝臓、胃、脾臓、脾臓、乳、膀胱、胎盤、睾丸、腎臓及び心臓：クローンテック社製）の各々から単離したポリA RNA (0.2  $\mu\text{g}$ ) を、ジエチルピロカーボネート処理された水の8  $\mu\text{l}$ 中で3'-アンカード・オリゴdTプライマーG (T) 15 MA (MはG、A及びCの混合液である) の25 pmolと混合し、65  $^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱した。この溶液に4  $\mu\text{l}$ の5 $\times$ ファースト・ストランド緩衝液 (BRL社製)、2  $\mu\text{l}$ の0.1 M DTT (BRL社製)、1  $\mu\text{l}$ の250 mM dNTPs (BRL社製)、1  $\mu\text{l}$



のリボヌクレアーゼ・インヒビター（40単位；TOYOBO社製）及び1  $\mu$  lのスーパースクリプトII逆転写酵素（200単位；BRL社製）を加えた。各反応液の最終容量は20  $\mu$  lであった。各溶液を37℃で1時間培養  
5 した後、30  $\mu$  lの蒸留した水の付加により2.5倍までに希釈し、使用時まで-20℃で貯蔵した。

cDNAは、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPで標識した（アマシャム社製）3'-アンカード・プライマーの存在下でPCRによって増幅した。このcDNAのPCR増幅は、  
10 以下のとおり実施された。即ち、各20  $\mu$  lのPCR混合液は、2  $\mu$  lのRT反応混合液、2  $\mu$  lの10 $\times$  PCR緩衝液（タカラ社製）、4  $\mu$  lの2.5 mM dNTPs、0.25  $\mu$  lのEx Taq DNAポリメラーゼ（5単位/m l；タカラ社製）、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP  
15 で標識した25 pmolの3'-アンカード・オリゴdTプライマー及び25 pmolの5'-プライマー（No. 20、配列番号：4に示す塩基配列の任意配列を有する10-merデオキシオリゴヌクレオチド・プライマー）を含んでいた。また、PCR反応は以下の条件で行なった。  
20 即ち、95℃で3分間、40℃で5分間及び72℃で5分間を1サイクルとして行ない、それから95℃で0.5分間、40℃で2分間及び72℃で1分間を40

サイクル行ない、最後に 72 °C で 5 分間反応させた。

PCR 反応サンプルをエタノールで抽出し、ホルム  
アミド・シーケンシング染料中に再懸濁して、6 % ア  
クリルアミド 7.5 M ウレア・シーケンシング・ゲル  
5 上で反応させた。ゲルは固定することなしに乾燥させ、  
一晩オートラジオグラフィーを実施した。

(1-2) 増幅された cDNA 断片のサブ・クローニング

予め乾燥ゲルを載せた 3 MM 濾紙上にラジオアクティ  
ブインクで印を付けておき、これとオートラジオグラム  
10 をあわせることにより、目的の cDNA を含むバンドが  
含まれるゲルを、3 MM 濾紙ごと切り出した後、300  
 $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O にて 1 時間攪拌した。ポリアクリルアミド  
・ゲルと濾紙を取り除いた後、cDNA を担体として 1  
 $\mu$ l の 10 mg / ml グリコーゲンと 0.3 M NaOAc の  
15 存在下、エタノール沈澱によって再回収し、10  $\mu$ l の  
dH<sub>2</sub>O に再溶解した。再増幅のために、5  $\mu$ l のこの溶  
液が用いられた。PCR の条件とプライマーは最初の  
PCR に対してと同じであった。適当な大きさの再増幅  
産物を第一の PCR 産物として再回収し、それからその  
20 PCR 産物を pUC118 ベクター (タカラ社製) の Hinc II 部位  
にクローニングした。核酸配列は ABI 377 自動シ  
ーケンサー (アプライド・バイオ・システムズ社製)

によって決定した。

上記方法にて、13のヒト組織から単離したmRNAを用いて異なる表出パターンを比較した結果、脾臓に特異的に発現した一つのPCR産物を確認した。これを

5 TSA305と命名した。

この産物は、371ヌクレオチドからなっていた。

FASTAプログラム(Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2444-2448 (1988))を使用するGenBank/EMBLデータ・ベース中のDNA配列  
10 とこのヌクレオチド・データとの比較より、このPCR産物が他の如何なる公知のDNA配列と相同性がないことが明らかとなった。

#### (1-3) cDNAのスクリーニング

ヒト正常脾臓cDNAライブラリーは、オリゴ(dT)  
15 +ランダムヘキサマープライムド・ヒト正常脾臓cDNAとUni-ZAP™ XR(ストラタジーン社製)を用いて、構築した。1×10<sup>8</sup>個のクローンの全体を上記方法によって単離し、[α-<sup>32</sup>P]-dCTPにて標識されたcDNA断片を用いてそのスクリーニングを行  
20 なった。陽性クローンを選択し、それらの挿入cDNA部をpBluescript II SK(-)中のイン・ビボに切り出した。

その結果、TSA305に対して約100のプラーク

が確認された。この結果より、全RNA間の転写量は、およそ0.01%であると計算された。TSA305に相同する集合したcDNA配列(TSA305)は、計算された分子量88768Daを有する794アミノ酸の蛋白をコードする2382ヌクレオチドのオープン・リーディング・フレームを含む7885ヌクレオチドを含んでいた。

一次配列からこの遺伝子の産物(TSA305蛋白)は、フィブロネクチンTypeIIコラーゲン結合ドメインを含む蛋白であることが明らかとなった。

その染色体上の位置は、インスリン依存性糖尿病(IDDM)の原因遺伝子が存在するとされる第14染色体q24.3-q31.1であった。

また、本発明遺伝子TSA305は、線虫のsele-1と高いホモロジーを有していた。

## (2) 組織における発現

組織におけるTSA305の発現プロファイルを調べるため、各種のヒト組織を用いたノーザンブロット分析を行った。

ノーザン・ブロット分析には、ヒトMTN(Multiple-Tissue Northern)ブロットIとII(クローンテック社製)を使用した。cDNA断片は、T3とT7プロモーター

配列のプライマー・セットを用い、PCRによって〔 $\alpha$ - $^{32}$ P〕-dCTPで標識した。増幅産物を含むメンブ  
ランをプレハイブリダイズ（条件は製品のプロトコル  
に従った）し、そしてそれから製品のプロトコルに従  
5 い、ハイブリダイゼーションを行なった。

ハイブリダイゼーション後、洗浄した膜を-80℃で  
24時間オートラジオグラフに露光した。その結果は図  
1に示すとおりである。

該図において、用いたヒト組織は、心臓(Heart)、脳  
10 (brain)、睪丸(Placenta)、肺(Lung)、肝臓(Liver)、骨  
格筋(Skeletal muscle)、腎臓(Kidney)、脾臓(Pancreas)、  
脾臓(Spleen)、胸腺(Thymus)、膀胱(Prostate)、胎盤  
(Testis)、卵巣(Ovary)、小腸(Small intestine)、結腸  
(Colon)及び末梢血白血球(Peripheral blood leukocyte)  
15 である。

該図より、TSA305に相同する転写体が脾臓  
(Pancreas)において特異的に観察された。

### (3) FISH

染色体の整列のためのFISHは、公知の方法  
20 (Takahashi E., et al., Hum. Genet., 86, 14-16  
(1990))に従って、各コスミドDNAの0.5  $\mu$ gをプロ  
ーブとして使用して実施した。FISHはプロビア

100フィルム（フジ社製、ISO100）又はCCDカメラ・システム（アプライド・イメージング、サイトビジョン社製）によって捕えられた。

その結果、100の典型的なR-バンド（前）分裂中期  
5 の細胞を試験したシグナルは、第14染色体のバンドq24.3-q31.1に局在していた。従って、TSA305染色体の局在部位は、14q24.3-q31.1と同定できた。

#### 10 (4) RT-PCR分析による膵臓癌細胞株と膵臓癌組織における転写物の発現

TSA305遺伝子の発現がヒト膵臓癌細胞株と膵臓癌組織において変異するかどうかを調べるために、4つの細胞株（Aspc1（転移性腺癌，J. Natl. Cancer Inst., 67, 563-569 (1981)），Bxpc3（腺癌・未分化，Cancer  
15 Invest., 4, 15-23 (1986)），MiaPaca2（腺癌，Int. J. Cancer, 19, 128-135 (1977)）及びPANC1（類上皮性、膵管癌，Int. J. Cancer, 15, 741-747 (1975)）と9の膵臓の癌組織（東京大学医科研究所、中村先生より供与）のRT-PCR分析を行なった。

20 即ち、全RNAをISOGEN（和光社製）を使用して細胞株と膵臓癌組織から単離した10μlの全RNAを10単位のRNaseフリーDNase I（ベーリン

ガー・マインハイム社製)で15分間処理し、フェノール-クロロホルムで2回抽出し、エタノールで沈澱させた。一本鎖cDNAをオリゴd(T)とランダムプライマーを使用してSuperscript I<sup>TM</sup> RNase H-逆転写酵素(ライフ・テクノロジー社製)によって合成した。

2  $\mu$  lの各産物をPCR増幅のために用いた。

配列番号: 5及び配列番号: 6として示す塩基配列のプライマーP1及びP2Sを、25サイクルのPCR増幅のために使用した。

10 尚、PCR反応は25 ng cDNA、10  $\mu$  M各プライマー、2.5 mM dNTP及び0.25 UのExtaq DNAポリメラーゼ(タカラ社製)を含む20  $\mu$  l溶液中で行なった。PCR産物は、エチジウム・ブロマイド染色した1.5%アガロースゲル中に溶解させた。

15 上記に従い、4種の細胞株(レーン1=Aspc1, レーン2=Bxpc3, レーン3=MiaPaca2, レーン4=PANC1)と正常膵臓組織(Normal Pancreas, レーン5)をRT-PCR分析した結果は、図2に示す通りである。尚、図の上段はTSA305の結果を、下段はコントロールと

20 しての $\beta_2$ -ミクログロブリン( $\beta_2$ -microglobulin)の結果を示す。

該図より、TSA305発現は、全ての癌組織におい

ては見当らず、正常膵臓組織（レーン 5 参照）にのみ認められることが判った。

(5) 膵癌における T S A 3 0 5 遺伝子の発現（R T - P C R）

5 T S A 3 0 5 遺伝子の発現を、膵癌患者サンプル（1 T、2 T、3 T、5 T、6 T、7 T、10 T 及び 11 T）、膵癌（Tumor Pancreas）及び正常膵（Invitrogen 社；Human Normal Pancreas）並びに同一患者膵臓の癌部（23 T）及び非癌部（23 N）につき、以下の通り、

10 R T - P C R 法により検出した。

各サンプルより m R N A を抽出し、T S A 3 0 5 の 1 5 8 1 - 2 3 8 2 b p（801 塩基対）を R T - P C R にて増幅させ、発現の有無を検出した。濃度コントロールとして  $\beta_2$ -ミクログロブリン（microglobulin）

15 を用いた。結果を図 3 に示す。

該図より、正常膵臓の発現に比べて、膵臓癌サンプル全例において T S A 3 0 5 遺伝子の発現の低下或いは欠損が観察された。

#### 産業上の利用可能性

20 本発明によれば新規な膵臓特異的遺伝子 T S A 3 0 5 及びこれによりコードされる蛋白が提供され、これらの利用により、膵臓癌等の癌や癌化の解明、その診断、予



防及び治療等に有用な技術が提供される。

5

10

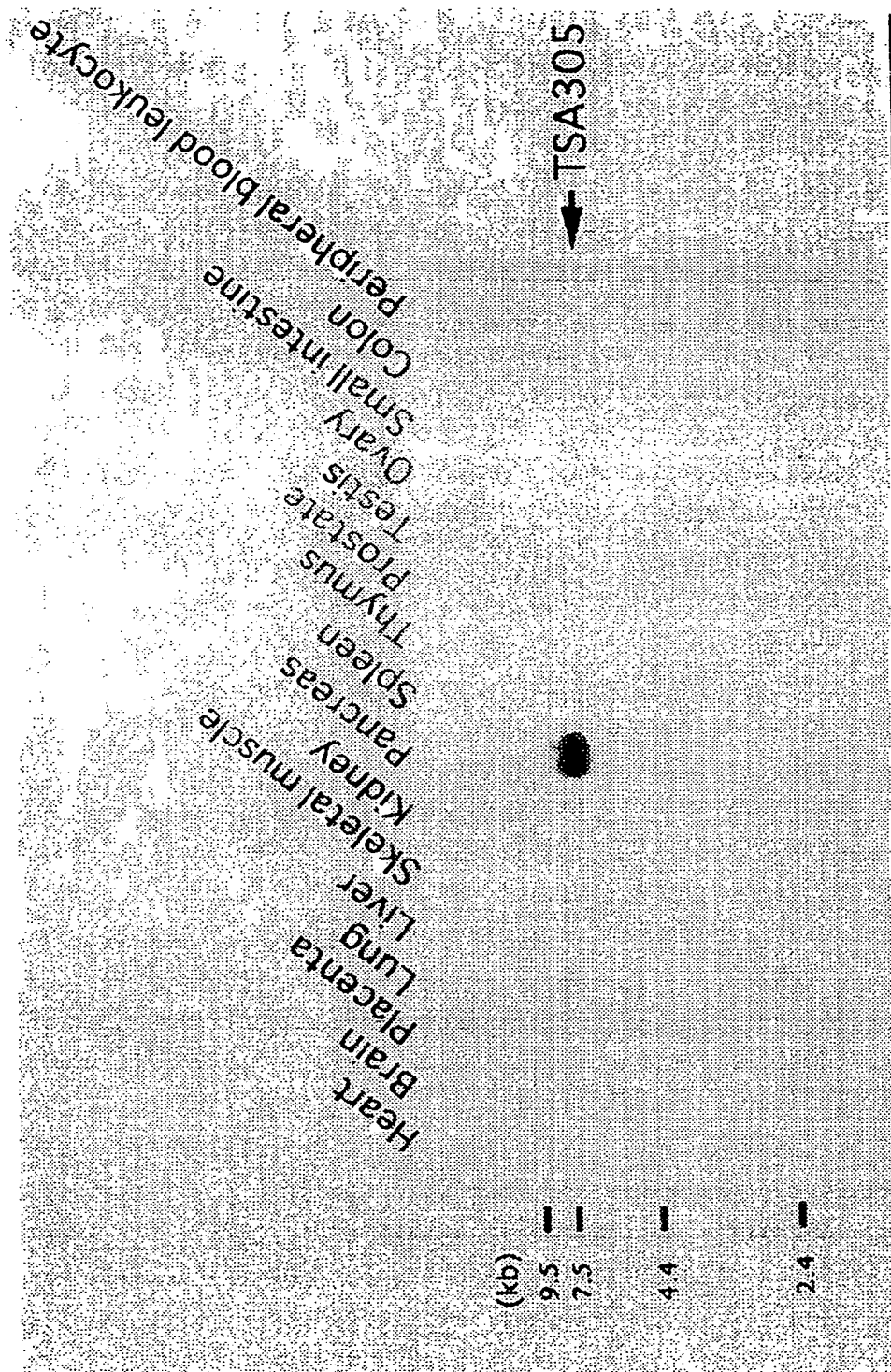
15

20

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む脾臓特異的遺伝子。
2. ヒト遺伝子である請求の範囲第1項に記載の遺伝子。
- 5 3. 塩基配列が配列番号：2で示されるものである請求の範囲第1項に記載の遺伝子。
4. ヒト遺伝子である請求の範囲第3項に記載の遺伝子。
5. 以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなる脾臓特異的遺伝子：
  - 10 (a) 配列番号：2で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド、
  - (b) 配列番号：2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
- 15 6. ヒト遺伝子である請求の範囲第5項に記載の遺伝子。
7. 請求の範囲第1項に記載の脾臓特異的遺伝子の検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用されるDNA断片である請求の範囲第5項に記載の遺伝子。
8. 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる脾臓
- 20 特異的蛋白質。
9. 請求の範囲第8項に記載の脾臓特異的蛋白質に結合性を有する抗体。

Fig. 1



F i g. 2

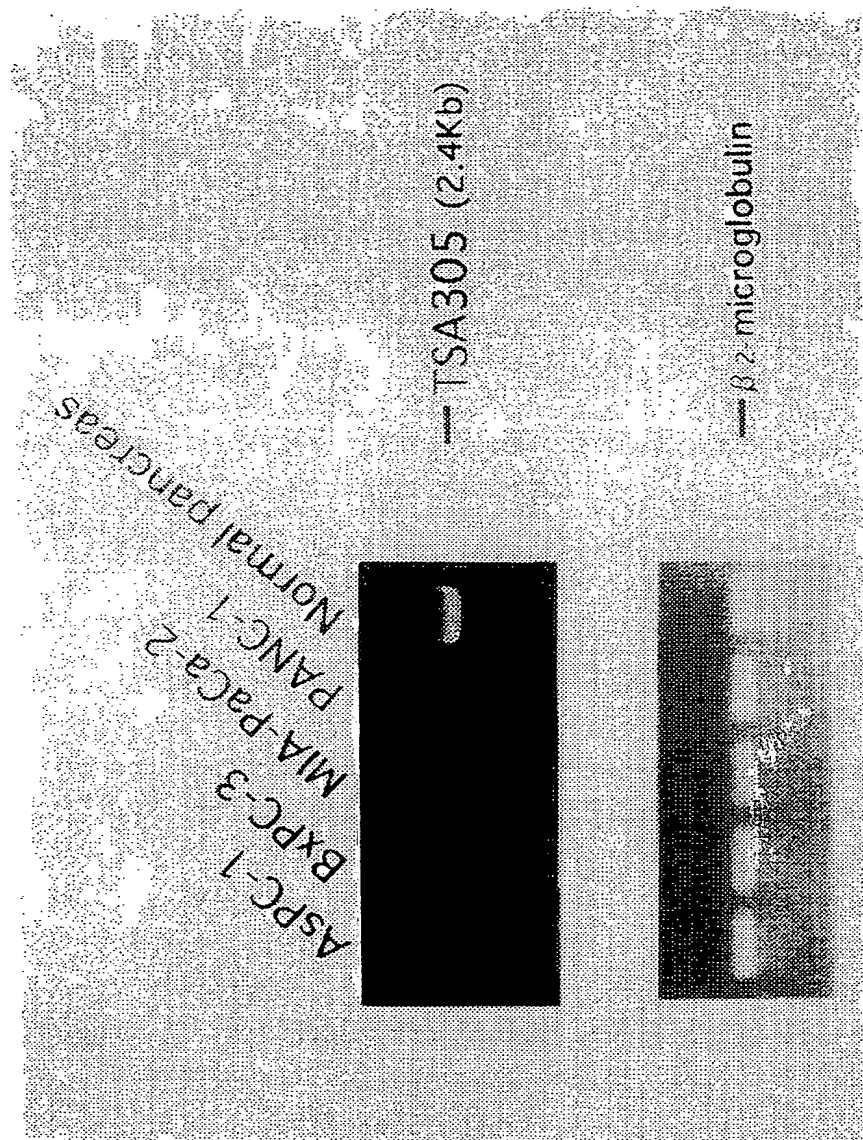
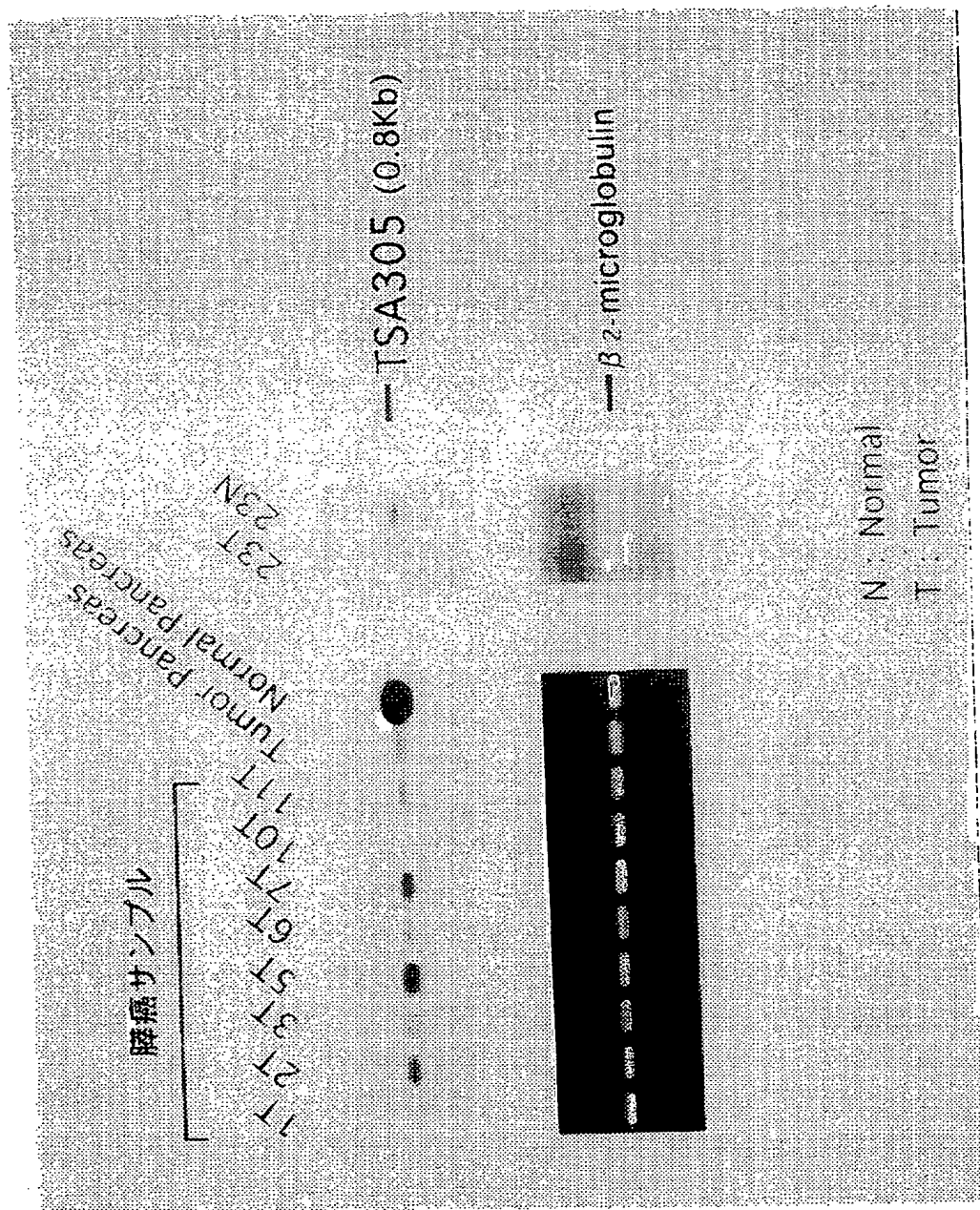


Fig. 3



1/15

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; TSA305 gene

&lt;130&gt; P98-53

&lt;150&gt; JP H9-3433789 and H10-126803

&lt;151&gt; 1997-11-28 and 1998-4-20

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 794

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human normal pancreas cDNA library

&lt;400&gt; 1

```

Met Arg Val Arg Ile Gly Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu
  1             5             10             15
Ser Leu Ala Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser
      20             25             30
Leu Asp Ser Lys Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His
      35             40             45
Thr Thr Ala Gly Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu
      50             55             60
Glu Ser Glu Leu Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys
      65             70             75             80
Ser Gln Glu Gly Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser
      85             90             95
Pro Asn Pro Glu Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys
      100            105            110

```

2/15

Pro Ala Leu Thr Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His  
 115 120 125  
 Phe Pro Phe Leu Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp  
 130 135 140  
 Gly Arg Glu Asp Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ala Lys  
 165 170 175  
 Arg Arg Gln Met Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys  
 180 185 190  
 Ile Leu Asn Gly Ser Asn Lys Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg  
 195 200 205  
 Tyr Leu Gln Lys Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg  
 210 215 220  
 Val Ser Tyr Ala Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Arg Glu Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys  
 245 250 255  
 Gly Gln Thr Ala Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn  
 260 265 270  
 Ser Ser Gln Ala Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly  
 275 280 285  
 Gly Asn Leu Ile Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly  
 290 295 300  
 Ile Gly Val Leu Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Val Ala Asn His Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val  
 325 330 335  
 Val Gln Arg Ile Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn

3/15

340	345	350
Ser Gly Met Leu Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala		
355	360	365
Glu Lys Gly Asp Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu		
370	375	380
His Gly Gly Arg Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr		
385	390	395
Phe Asn Leu Ala Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu		
405	410	415
Gly Lys Met Tyr Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu		
420	425	430
Thr Ala Leu His Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val		
435	440	445
Gly Gln Ser Gly Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln		
450	455	460
Val Asn Tyr Asp Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln		
465	470	475
Gly Trp Val Asp Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly		
485	490	495
Ile Gly Val Lys Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu		
500	505	510
Ala Ser Gln Gly Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met		
515	520	525
His Ala Ser Gly Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu		
530	535	540
Leu Phe Lys Asn Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met		
545	550	555
Thr Ala Tyr Asn Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile		
565	570	575



4/15

Gln Tyr Leu Leu Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn  
 580 585 590

Ala Ala Phe Ile Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn  
 595 600 605

Glu Thr Tyr Pro Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln  
 610 615 620

Gly Tyr Thr Val Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly  
 625 630 635 640

Phe Gly Thr Asp Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu  
 645 650 655

Ala Ser Glu Gln Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr  
 660 665 670

Met His Glu Lys Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys  
 675 680 685

Arg Phe Tyr Asp Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro  
 690 695 700

Val Phe Leu Ala Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr  
 705 710 715 720

Ile Arg Glu Thr Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp  
 725 730 735

Gln Leu Leu Gly Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala  
 740 745 750

Leu Leu Leu Gly Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp  
 755 760 765

Met Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln  
 770 775 780

Glu Gly Pro Pro Glu Gln Gln Pro Pro Gln  
 785 790

5/15

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2382

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human nomal pancreas cDNA library

&lt;400&gt; 2

atgcgggtcc ggatagggct gacgtgctg ctgtgtgcgg tgctgctgag cttggcctcg	60
gcgtcctcgg atgaagaagg cagccaggat gaatccttag attccaagac tactttgaca	120
tcagatgagt cagtaaagga ccatactact gcaggcagag tagttgctgg tcaaatattt	180
cttgattcag aagaatctga attagaatcc tctattcaag aagaggaaga cagcctcaag	240
agccaagagg gggaaagtgt cacagaagat atcagctttc tagagtctcc aaatccagaa	300
aacaaggact atgaagagcc aaagaaagta cggaaaccag ctttgaccgc cattgaaggc	360
acagcacatg gggagccctg ccacttcctt tttcttttcc tagataagga gtatgatgaa	420
tgtacatcag atgggagggg agatggcaga ctgtggtgtg ctacaaccta tgactacaaa	480
gcagatgaaa agtggggctt ttgtgaaact gaagaagagg ctgctaagag acggcagatg	540
caggaagcag aaatgatgta tcaaactgga atgaaaatcc ttaatggaag caataagaaa	600
agccaaaaaa gagaagcata tcggtatctc caaaaggcag caagcatgaa ccataccaaa	660
gccctggaga gagtgtcata tgctctttta tttggtgatt acttgccaca gaatatccag	720
gcagcgagag agatgtttga gaagctgact gaggaaggct ctccaaggg acagactgct	780
cttggtcttc tgatgcctc tggacttggt gtttaattcaa gtcaggcaaa ggctcttgta	840
tattatacat ttggagctct tgggggcaat ctaatagccc acatggtttt gggttacaga	900
tactgggctg gcatcggcgt cctccagagt tgtgaatctg ccctgactca ctatcgtctt	960
gttgccaatc atgttgctag tgatatctcg ctaacaggag gctcagtagt acagagaata	1020
cggctgcctg atgaagtgga aaatccagga atgaacagtg gaatgctaga agaagatttg	1080
attcaatatt accagttcct agctgaaaaa ggtgatgtac aagcacagg tggctcttgga	1140
caactgcacc tgcacggagg gcgtggagta gaacagaatc atcagagagc atttgactac	1200
ttcaatttag cagcaaatgc tggcaattca catgccatgg cttttttggg aaagatgtat	1260
tcggaaggaa gtgacattgt acctcagagt aatgagacag ctctccacta ctttaagaaa	1320
gctgctgaca tgggcaaccc agttggacag agtgggcttg gaatggccta cctctatggg	1380
agaggagttc aagttaatta tgatctagcc cttaagtatt tccagaaagc tgctgaacaa	1440

6/15

```

ggctgggtgg atgggcagct acagcttggg tccatgtact ataatggcat tggagtcaag 1500
agagattata aacaggcctt gaagtatitt aatttagctt ctcagggagg ccatactctg 1560
gctttctata acctagctca gatgcatgcc agtggcaccg gcgtgatgcg atcatgtcac 1620
actgcagtgg agttgtttaa gaatgtatgt gaacgaggcc gttggtctga aaggcttatg 1680
actgcctata acagctataa agatggcgat tacaatgctg cagtgatcca gtacctctc 1740
ctggctgaac agggctatga agtggcacia agcaatgcag cttttattct tgatcagaga 1800
gaagcaagca ttgtaggtga gaatgaaact tatcccagag ctttgctaca ttggaacagg 1860
gccgcctctc aaggctatac tgtggctaga attaagctcg gagactacca tttctatggg 1920
tttggcaccg atgtagatta tgaaactgca ttatttcatt accgtctggc ttctgagcag 1980
caacacagtg cacaagctat gttaaatctg ggatatatgc atgagaaagg actgggcatt 2040
aaacaggata ttcaccttgc gaaacgtttt tatgacatgg cagctgaagc cagcccagat 2100
gcacaagttc cagtcttctt agccctctgc aaattgggag tcgtctattt cttgcagtac 2160
atacgggaaa caaacattcg agatatgttc acccaacttg atatggacca gcttttggga 2220
cctgagtggg acctttacct catgaccatc attgcgctgc tgttgggaac agtcatagct 2280
tacaggcaaa ggcagcacca agacatgcct gcacccaggc ctccagggcc acggccagct 2340
ccaccccagc aggaggggcc accagagcag cagccaccac ag 2382

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 7885

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human normal pancreas cDNA library

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cDS

&lt;222&gt; (46).. (2428)

&lt;400&gt; 3

```

gcgaaggcga cagctctagg ggttggcacc ggccccgaga ggagg atg cgg gtc 54

```

Met Arg Val

1

```

cgg ata ggg ctg acg ctg ctg tgt gcg gtg ctg ctg agc ttg gcc 102

```

7/15

Arg Ile Gly Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala  
 5 10 15  
 tcg gcg tcc tcg gat gaa gaa ggc agc cag gat gaa tcc tta gat tcc 150  
 Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser Leu Asp Ser  
 20 25 30 35  
 aag act act ttg aca tca gat gag tca gta aag gac cat act act gca 198  
 Lys Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His Thr Thr Ala  
 40 45 50  
 ggc aga gta gtt gct ggt caa ata ttt ctt gat tca gaa gaa tct gaa 246  
 Gly Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu Glu Ser Glu  
 55 60 65  
 tta gaa tcc tct att caa gaa gag gaa gac agc ctc aag agc caa gag 294  
 Leu Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys Ser Gln Glu  
 70 75 80  
 ggg gaa agt gtc aca gaa gat atc agc ttt cta gag tct cca aat cca 342  
 Gly Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asn Pro  
 85 90 95  
 gaa aac aag gac tat gaa gag cca aag aaa gta cgg aaa cca gct ttg 390  
 Glu Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys Pro Ala Leu  
 100 105 110 115  
 acc gcc att gaa ggc aca gca cat ggg gag ccc tgc cac ttc cct ttt 438  
 Thr Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His Phe Pro Phe  
 120 125 130  
 ctt ttc cta gat aag gag tat gat gaa tgt aca tca gat ggg agg gaa 486  
 Leu Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp Gly Arg Glu  
 135 140 145  
 gat ggc aga ctg tgg tgt gct aca acc tat gac tac aaa gca gat gaa 534  
 Asp Gly Arg Leu trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys Ala Asp Glu  
 150 155 160

8/15

aag tgg ggc ttt tgt gaa act gaa gaa gag gct gct aag aga cgg cag	582
Lys Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ala Lys Arg Arg Gln	
165 170 175	
atg cag gaa gca gaa atg atg tat caa act gga atg aaa atc ctt aat	630
Met Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys Ile Leu Asn	
180 185 190 195	
gga agc aat aag aaa agc caa aaa aga gaa gca tat cgg tat ctc caa	678
Gly Ser Asn Lys Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg Tyr Leu Gln	
200 205 210	
aag gca gca agc atg aac cat acc aaa gcc ctg gag aga gtg tca tat	726
Lys Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg Val Ser Tyr	
215 220 225	
gct ctt tta ttt ggt gat tac ttg cca cag aat atc cag gca gcg aga	774
Ala Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln Ala Ala Arg	
230 235 240	
gag atg ttt gag aag ctg act gag gaa ggc tct ccc aag gga cag act	822
Glu Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys Gly Gln Thr	
245 250 255	
gct ctt ggc ttt ctg tat gcc tct gga ctt ggt gtt aat tca agt cag	870
Ala Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn Ser Ser Gln	
260 265 270 275	
gca aag gct ctt gta tat tat aca ttt gga gct ctt ggg ggc aat cta	918
Ala Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly Gly Asn Leu	
280 285 290	
ata gcc cac atg gtt ttg ggt tac aga tac tgg gct ggc atc ggc gtc	966
Ile Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly Ile Gly Val	
295 300 305	
ctc cag agt tgt gaa tct gcc ctg act cac tat cgt ctt gtt gcc aat	1014
Leu Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu Val Ala Asn	

9/15

310	315	320	
cat gtt gct agt gat atc tcg cta aca gga ggc tca gta gta cag aga			1062
His Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val Val Gln Arg			
325	330	335	
ata cgg ctg cct gat gaa gtg gaa aat cca gga atg aac agt gga atg			1110
Ile Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn Ser Gly Met			
340	345	350	355
cta gaa gaa gat ttg att caa tat tac cag ttc cta gct gaa aaa ggt			1158
Leu Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala Glu Lys Gly			
360	365	370	
gat gta caa gca cag gtt ggt ctt gga caa ctg cac ctg cac gga ggg			1206
Asp Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu His Gly Gly			
375	380	385	
cgt gga gta gaa cag aat cat cag aga gca ttt gac tac ttc aat tta			1254
Arg Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr Phe Asn Leu			
390	395	400	
gca gca aat gct ggc aat tca cat gcc atg gcc ttt ttg gga aag atg			1302
Ala Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu Gly Lys Met			
405	410	415	
tat tcg gaa gga agt gac att gta cct cag agt aat gag aca gct ctc			1350
Tyr Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu Thr Ala Leu			
420	425	430	435
cac tac ttt aag aaa gct gct gac atg ggc aac cca gtt gga cag agt			1398
His Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val Gly Gln Ser			
440	445	450	
ggg ctt gga atg gcc tac ctc tat ggg aga gga gtt caa gtt aat tat			1446
Gly Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln Val Asn tyr			
455	460	465	
gat cta gcc ctt aag tat ttc cag aaa gct gct gaa caa ggc tgg gtg			1494

10/15

Asp Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln Gly Trp Val	
470 475 480	
gat ggg cag cta cag ctt ggt tcc atg tac tat aat ggc att gga gtc	1542
Asp Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly Ile Gly Val	
485 490 495	
aag aga gat tat aaa cag gcc ttg aag tat ttt aat tta gct tct cag	1590
Lys Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu Ala Ser Gln	
500 505 510 515	
gga ggc cat atc ttg gct ttc tat aac cta gct cag atg cat gcc agt	1638
Gly Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met His Ala Ser	
520 525 530	
ggc acc ggc gtg atg cga tca tgt cac act gca gtg gag ttg ttt aag	1686
Gly Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu Leu Phe Lys	
535 540 545	
aat gta tgt gaa cga ggc cgt tgg tct gaa agg ctt atg act gcc tat	1734
Asn Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met Thr Ala Tyr	
550 555 560	
aac agc tat aaa gat ggc gat tac aat gct gca gtg atc cag tac ctc	1782
Asn Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile Gln Tyr Leu	
565 570 575	
ctc ctg gct gaa cag ggc tat gaa gtg gca caa agc aat gca gcc ttt	1830
Leu Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn Ala Ala Phe	
580 585 590 595	
att ctt gat cag aga gaa gca agc att gta ggt gag aat gaa act tat	1878
Ile Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn Glu Thr Tyr	
600 605 610	
ccc aga gct ttg cta cat tgg aac agg gcc gcc tct caa ggc tat act	1926
Pro Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln Gly Tyr Thr	
615 620 625	

11/15

gtg gct aga att aag ctc gga gac tac cat ttc tat ggg ttt ggc acc	1974
Val Aal Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly Phe Gly Thr	
630 635 640	
gat gta gat tat gaa act gca ttt att cat tac cgt ctg gct tct gag	2022
Asp Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu Ala Ser Glu	
645 650 655	
cag caa cac agt gca caa gct atg ttt aat ctg gga tat atg cat gag	2070
Gln Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr Met His Glu	
660 665 670 675	
aaa gga ctg ggc att aaa cag gat att cac ctt gcg aaa cgt ttt tat	2118
Lys Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys Arg Phe Tyr	
680 685 690	
gac atg gca gct gaa gcc agc cca gat gca caa gtc cca gtc ttc tta	2166
Asp Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro Val Phe Leu	
695 700 705	
gcc ctc tgc aaa ttg ggc gtc gtc tat ttc ttg cag tac ata cgg gaa	2214
Ala Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr Ile Arg Glu	
710 715 720	
aca aac att cga gat atg ttc acc caa ctt gat atg gac cag ctt ttg	2262
Thr Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp Gln Leu Leu	
725 730 735	
gga cct gag tgg gac ctt tac ctc atg acc atc att gcg ctg ctg ttg	2310
Gly Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala Leu Leu Leu	
740 745 750 755	
gga aca gtc ata gct tac agg caa agg cag cac caa gac atg cct gca	2358
Gly Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp Met Pro Ala	
760 765 770	
ccc agg cct cca ggg cca cgg cca gct cca ccc cag cag gag ggg cca	2406
Pro Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln Glu Gly Pro	



12/15

775	780	785	
cca gag cag cag cca cca cag t aataggcact ggggccagcc ttgatcagt			2458
Pro Glu Gln Gln Pro Pro Gln			
790			
acagcgaagg aagttatctg ctgggaacac ttgcatttga tttaggacct tggatcagt			2518
gtcacctccc agaagaggca cggcacaagg aagcattgaa ttcctaaagc tgcttagaat			2578
ctgatgccctt tattttcagg gataagtaac tcttacctaa actgagctga atgtttgttt			2638
cagtgccata tggagtaaca actttcagt gctttttttt ttcttttctg gaaacatatg			2698
tgagacactc agagtaatgt ctactgtatc cagctatctt tctttggatc ctttttgtca			2758
ttatttcagt gtgcataagt tcttaatgtc aaccatcttt aaggtattgt gcatcgacac			2818
taaaaactga tcagtgttaa aaaggaaaac ccagttgcaa gtttaaactg gttcgaaagt			2878
ctgaaaatag aacttgcctt ttaagttaaa aaaaaaaaaa aagctatctt gaaaatgttt			2938
tggaaactgcg ataactgaga aacttcttac cagtccacat gcaattaaac atattcagca			2998
tatttgttat tttaaaaggg agggttggga ggtttcttat tggtgattgt cacacggtat			3058
accatactcc tctccttcaa agaataaaag gccttggttaa ggagtttttt gtgagcttta			3118
cttctttgga atggaatata cttatgcaaa accttggtgaa ctgactcctt gactaacgc			3178
gagtttgccc cacctactct gtaatttgc tgtttgtttt gaataataca gagccttgat			3238
ccagaagcca gaggatggac taagtgggag aaattagaaa acaaaacgaa ctctggttgg			3298
ggactacga tcacagacac agacatactt ttcctaaagt tgaagcattt gttcccagga			3358
tttattttac tttgcatttc tttttgcaca aagaacacat caccttcctg aattctttaa			3418
atatgaaata tcattgccag ggtatggctt acagtgacta ctattatcaa tactaaaact			3478
cagagaatca aagatggatt aaactcagt gttgatgaaa gccaaaacct gtttgactg			3538
ttctatacta ttcaggtatc tttttatttc tgatagtgtt atattataat agaaagccag			3598
ccactgctta gctatcatag tcaccatttt ctcactgtta acattaggaa aatcaaggct			3658
actatgcttc aggattgtct ggttaaatag tatgggaaaa aaactgaaga gtttcaacat			3718
aattacacac gtgaaataat tacagcttaa actgaatttg tatttcattt tattgtcaga			3778
tgggtggtgtt caccagcctg tatcttgtct gagactgcat tcgtatctga gcaggttttc			3838
tatgcctact gatgtcagta tgtttatact aaccttcatt cttttttccc agaatccctc			3898
atctgccaga aaacttgaaa agttttattgc ttgtagagtt gtactgcttt gatttttgaa			3958

13/15

gttgggtag tagttagaac tagatttaac tagtctataa tgaacatgaa ggcttttata 4018  
tatgaagttg tatacctttt tgtgtttaga gaattatggg aaacctggta agcaaaactt 4078  
tcctcccaga taattgcttc caaatcgaa gagttagtca ccaagagagc catatgtatg 4138  
aaagcgtatc tgtgaaaggt aggaaactta cccccctaa gtgtaatgtt gctttaggca 4198  
actcttgtaa atagtgagac ttgtttggtc tcttcatgtt agagatttga gtgcagttgg 4258  
tacagtactt tgggtgtctc accactgtcc ctctccccg ctcaaaaata agtgtaatcc 4318  
acggtagcag ccacacttcc ttcagaagga actgttataa tttattttaa agttgaaaaa 4378  
ccaccaaga tgactaccaa ctttcacttt tttcttctg ccatccacc tcattttccc 4438  
tttagcaaga tttttatata taactttcct tccctccatt gactacgtgc tttgagaaaa 4498  
catttcttaa aacagtgtgt gccacctaag gctggatggg aaagtgcagt cttgttggtc 4558  
atataaaaaa cacacttctt attagtttac ccacttgcct tttctattg ttaatgttct 4618  
gaatttcctt ttcttggctt gtttctactt cattttaacc ctgggtcact tgctgccagc 4678  
agtttgtgaa tgggtgtctt caaataactt agttcttatg gcttcaacta aagactgtct 4738  
caaaaatact ttgtctctt ctctttttt gttcatggga catggtacct aagcaaatag 4798  
gagttgggtt tggtttttct cctaaaataa tgctcaatac ttacctaatc aaatggcatc 4858  
catttgaata aaatgacaat aactaaagct agttaatgtc agtgacatta aactaactcc 4918  
aggattcagg agttttaatg ttagaattta gatttaacag atagagtgtg gcttcatttg 4978  
tccatggtag cccatctctc ctaagacctt ttctagtctg tcttctgcc ttcgaacttg 5038  
atgacagtaa aacctgttt agtattctct tgtgcatttg gttgttggg tagccgactg 5098  
tcttgaact attcattttg ctctagttt tattttacag aggtagcatt ggtgggtttt 5158  
ttttttttt tctgtctctg tgttgaagt ttcagtttct gtttctagg taaggcttat 5218  
ttttgattag cagtcaatgg caaagaaaaa gtaaatcaaa gatgacttct tttcaaatg 5278  
tatggccctt ttattgcact ttaactcag atgaatttat aaattattaa tcttgatact 5338  
aaggatttgt tacttttttg catattaggt taatttttac cttacatgtg agagtcttac 5398  
cactaagcca ttctgtctct gtactgttgg gaagttttgg aaaccttgc cagtgatctg 5458  
gtgatgatct gatgatttat ttaaagagcc gttgatgcct ccaggaaact taagtatttt 5518  
attaatatat atataggaat tttttttat tttgcttgt cttctctcc ctcttttat 5578  
cctcatgttc attcttcaaa ccagtgtttt ggaagtatgc atgcaggcct ataaatgaaa 5638  
aacacaattc tttatgtgta tagcatgtgt attaatgtct aactacatac gcaaaaactt 5698

14/15

ccittacaga ggttcggact aacatttcac atgcacattt caaaacaaga tgtgtcatga	5758
aaacagcccc ttacctgcc aagacaagca gggctatatt tcagtgcag ctggatattt	5818
tgtttctgaa agtgaatctc ataatatata tatgtattac acattattat gactagaagt	5878
atgtaagaaa tgatcagaac aaaagaaaat ttctattttc atgcaaata ttttcatcag	5938
tcatcactct caaatataaa ttaaaatata acactcctga atgcctgagg cacgatctgg	5998
attttaaatg tgtggtattc attgaaaaga agctctccac ccacttggtta tttcaagaaa	6058
atttaaaacg atcccaagga aagatgattt gtatgttaaa gtgactgcac aagtaaaagt	6118
ccaatgttgt gtgcatgaaa aggattcctt ggttatgtgc agggaatcat ctcacatgct	6178
gtttttccta ttgggtttga gaaacaggct gacactattc tctttgatta gaaaataaac	6238
tcataaaact cataatgttg atataatcaa gatgttaacc actataaata tgtagaagag	6298
gaagtittta atagacctta agctggcatt gtgaaggaac accatggtag actctttttg	6358
gtaatggtat ttgtatttta atgaaatgca gtataaaggt tggatgaagt taataataat	6418
tgtgtaaaca aatcctgttt aatagaagag atgtacagaa tcgttttggt actgtatctt	6478
gaaacttgtg aaataaagat tccacttttg gttatcctgt atgctgtaat ataccacaac	6538
caagcaccct ttccagacag acttttttta agctgaatga atccaatttt ttaatgtttt	6598
ttggaaattc agaagcttct gaaaacattc acttgtggca atttgaattt atctttcatt	6658
ttaaactcct gaaattcaga tttttacaag tccaatatg ccctagggag aacatgaatt	6718
tgctaagaaa tgttatcttt taaatctctg atatctttgt ctggaagcag ccttgatatg	6778
tagtaagcgt gattcacttt agcctgatta taatattatt tatctaaagt ttgtttatgc	6838
attgccttgt cccaggaatt ttttaagagg acttgcagag acacgtacca cacagtaaca	6898
tttagactaa atatgctctg agtaaaggag aaatgaaaaa atattaaatc aagagtgaac	6958
atgtacacaa agtgcaattg gaagtgggct acaaatttag cccccagctt cccagcaggc	7018
aactcaaaga ggtaactgag gtaaaatgtt ccagctcaga agcattggat ctggataaa	7078
aagcctacat gatgcaaaact gtggcaactg agatgtcaga tctcaagatc tcaaattgta	7138
cttgtgggag cacagtcagt gaccccagat gaccttgact gacctaaaag ttgtggggga	7198
agtcggatgt cagagcctta acaccagcag gtgaccatcc aacctggggc aatgcctgcc	7258
tgttcaccac ttagcctctt tctggcaagt cattagaatg tctccatct tcattggctg	7318
caacttgatg agctacagcc tctttcctaa ctccctttat gatgctagtt taggttggtt	7378
ataccagctt ggaagtatgc ttagattaag ttacagcaga tacacaaatt agatgcaagt	7438

15/15

```

aaaaaaaaatc agaatttctg tagtagaaac tacgaaaaat aaaaaggaaa gtttttactt 7498
tttgggtatt tttttacgaa taagaaaaag tgagcgtaa tcagttcaaa aggaggtagt 7558
gctgtgtaat gggctttgta cgttccttct catgtcactt acgtcactac ttcgccatca 7618
aattgaacaa gcttttaatt agatcctgaa aattcactat gctagtagtt tattggtagt 7678
attatatttt gagtagaact ctgattttcc ctagaggcca aattcttttt atctgggtta 7738
atttctttta aacataacaa tgtaaagct gaattgtata ttaaattcca tttctaaaaa 7798
ccacacaatt ttttctcatg taagttgagt ggaatgtggt tagttaactg aatttggaat 7858
gttcatataa ataatttggt gctgctc 7885

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer sequence for PCR of TSA305

&lt;400&gt; 4

```

gatctgacac 10

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer sequence for PCR of TSA305

&lt;400&gt; 5

```

gatcggatcc aggaggatgc ggggccgg 28

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer sequence for PCR of TSA305

&lt;400&gt; 6

```

gatcctcgag ttactgtggt ggctgctgct 30

```